

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 511 702

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 16174

(54) Anticorps monoclonaux antipoliavirus pour l'identification du type et la différenciation intratypique de souches isolées de poliovirus, hybrides cellulaires pour leur fabrication et procédé de diagnostic *in vitro* mettant en jeu des anticorps.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 N 7/00, 5/02 // C 12 R 1/91.

(22) Date de dépôt..... 24 août 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 8 du 25-2-1983.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RE-
CHERCHE MEDICALE. — FR.

(72) Invention de : André Boue, Nicole Cabau-Philippon, Philippe Couillin, Radu Crainic et Florian
Heraud.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

ANTICORPS MONOCLONAUX ANTIPOLIOVIRUS POUR L'IDENTIFICATION DU TYPE ET LA DIFFERENCIATION INTRATYPIQUE DE SOUCHES ISOLEES DE POLIOVIRUS, HYBRIDES CELLULAIRES POUR LEUR FABRICATION ET PROCEDE DE DIAGNOSTIC *IN VITRO* METTANT EN JEU DES ANTICORPS.

L'invention concerne des anticorps monoclonaux antipoliomyélitiques pour l'identification du type et la différenciation intratypique d'une souche isolée de poliovirus, notamment pour la détermination de
5 l'origine sauvage ou vaccinale de cette souche de poliovirus, des hybrides cellulaires pour la fabrication de ces anticorps et un procédé pour réaliser les susdites identification et différenciation.

Les anticorps sécrétés par les lignées
10 d'hybridomes étant monoclonaux, ils sont en principe dirigés contre un seul déterminant antigénique, et constituent donc un matériel de choix pour l'étude de la variation antigénique.

On sait qu'il existe trois types sérologiques
15 de poliovirus (types 1, 2 et 3) qui ont les mêmes caractères biologiques et la même propriété de provoquer chez l'homme la poliomyélite paralytique. Les trois types sont séparables les uns des autres par réaction avec les anticorps respectifs dans des tests de reconnaissance
20 sérologique. En effet les anticorps relatifs à des antigènes appartenant à un type déterminé neutralise spécifiquement la propriété du poliovirus correspondant de se répliquer dans la cellule animale.

En sus des souches sauvages virulentes qui
25 existent dans l'environnement, provenant d'individus excréteurs de virus, on trouve aussi dans la nature des souches atténuées non virulentes. Les souches atténuées non virulentes proviennent essentiellement de sujets qui ont reçu le vaccin antipoliomyélitique oral (appelé
30 vaccin Sabin). Les sujets vaccinés deviennent porteurs de virus et excrètent dans les selles, pendant de longues

périodes, le virus du vaccin.

La présence chez l'individu sain ou dans l'environnement (eaux potables ou résiduelles) du poliovirus pose le problème de l'origine de ce virus. Il faut
5 savoir par un test simple, si ce virus provient du vaccin oral, ou s'il s'agit d'un virus sauvage. Ce problème a été abordé par l'O.M.S. (J. Biol. Standard 9-163 (1981)), pendant plusieurs études collaboratives, sans pouvoir dégager un procédé efficace, dans un rapport intitulé
10 "Markers of poliovirus strains from cases temporarily associated with the use of live poliovirus vaccine" (Marqueurs de souches de poliovirus associés à l'utilisation du vaccin vivant de poliovirus).

L'invention a pour but de remédier à ces
15 difficultés, de fournir des moyens et plus particulièrement des batteries d'anticorps permettant de réaliser les identifications de type et différenciations intratypiques de souches à l'intérieur d'un même type de poliovirus, une technique de fabrication de ces anticorps et une méthode pour les mettre en oeuvre dans ces
20 essais d'identification et de différenciation intratypique.

L'invention met à profit la découverte qui a été faite qu'il était possible d'isoler des anticorps
25 spécifiquement dirigés contre un nombre réduit, voire un seul déterminant antigénique, à partir de cultures d'hybrides cellulaires, préalablement formés dans les conditions qui seront indiquées ci-après, ces spécificités pouvant être orientées selon les besoins, soit à
30 l'égard à la fois des souches sauvages et des souches atténuées ou seulement à l'égard de l'une ou de l'autre dans un type donné.

L'invention tire profit de la capacité de certains hybrides cellulaires ou "hybridomes" de produire des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés
35 contre un seul déterminant antigénique.

L'invention fait application des techniques décrites par KOHLER et MILSTEIN (1975 - "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity" - Nature, 256, 495), qui ont
5 montré que des cellules provenant de tumeurs myélomateuses de souris pouvaient être fusionnées avec des cellules immunocytes, plus particulièrement des cellules spléniques d'un animal immunisé au préalable, pour obtenir des cellules hybrides qui acquièrent la propriété
10 "d'immortalité" des cellules de tumeurs myélomateuses et la capacité des cellules d'immunocytes, notamment des cellules spléniques, de sécréter des quantités importantes d'anticorps homogènes.

Il est remarquable que l'on ait pu, par la
15 sélection de lignées d'hybridomes monoclonaux, dans les conditions qui seront indiquées plus loin, isoler des hybridomes producteurs d'anticorps qui, d'une part, sont suffisamment différenciés pour distinguer des souches sauvages et des souches atténuées et, d'autre part, des
20 anticorps distincts, capables de reconnaître à la fois et les unes et les autres à l'intérieur du même type.

L'originalité de l'invention réside entre autres dans le fait d'avoir posé dans ces termes le problème de la recherche des anticorps distincts, qui
25 permettrait d'opérer les discriminations voulues, et d'en avoir tiré les conséquences pour la mise au point d'une méthode d'identification et de différenciation applicable à des souches nouvellement isolées sur le terrain, dans des conditions n'impliquant pas des essais
30 techniquement délicats ou compliqués.

Dans l'un de ses premiers aspects, l'invention concerne donc une batterie d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic et l'identification de poliovirus, caractérisée par trois groupes d'anticorps à l'égard de
35 poliovirus, appartenant respectivement aux sous-types sérologiques (1), (2) ou (3), les anticorps monoclonaux de chaque groupe se répartissant en
- une première catégorie d'anticorps actifs, mais ne pré-

sentant pas de différenciation intratypique,

- une deuxième catégorie d'anticorps actifs contre les souches atténuées, mais essentiellement dépourvus d'activité à l'égard des souches sauvages correspondantes,
- 5 - une troisième catégorie d'anticorps actifs contre la souche sauvage appartenant au sous-type sérologique considéré, mais essentiellement dépourvus d'activité à l'égard des souches atténuées correspondantes.

- De préférence, les anticorps appartenant
- 10 aux première et deuxième catégories dans chacun des groupes susdits sont respectivement actifs contre :
- la souche LSc 2ab,
 - la souche P 712 CH 2ab,
 - la souche Leon 12a1b.

- 15 . Ces dernières souches, appelées aussi souches Sabin, sont en effet celles qui sont le plus couramment utilisées dans le monde entier pour la constitution des vaccins vivement atténués. Elles sont disponibles dans la plupart des laboratoires et peu-
- 20 vent être obtenues auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé. Elles sont essentiellement à l'origine de la plupart des souches atténuées que l'on trouve maintenant dans l'environnement, aux côtés des souches sauvages, en particulier des souches Mahoney, MEF 1
- 25 et Saukett, dont elles ont en fait été dérivées. Comme déjà indiqué plus haut, on sait que les techniques usuelles ne permettent pas, à l'intérieur d'un même type, de distinguer les souches sauvages et les souches atténuées.

- 30 Dans une batterie préférée d'anticorps selon l'invention, les anticorps appartenant aux première et troisième catégories, dans chacun des groupes susdits, sont respectivement actifs contre ces souches, c'est-à-dire :

- 35 - la souche Mahoney,

On sait en effet que les souches atténuées LSc 2ab, P 712 CH 2ab et Leon 12a1b sont dérivées des souches sauvages.

L'invention concerne aussi la batterie
5 d'hybrides cellulaires pour la production des groupes d'anticorps monoclonaux qui ont été définis plus haut et qui sont caractérisés en ce qu'ils résultent de la fusion des cellules d'une lignée myélomateuse et de
10 cellules immunocytes, notamment de rates d'animaux, respectivement vaccinés au préalable contre des polio-virus atténués, d'une part, sauvages, d'autre part, provenant de cultures des trois types correspondants.

Les techniques de culture mises en oeuvre, dont un exemple sera d'ailleurs indiqué plus loin,
15 sont en elles-mêmes connues. On peut à cet égard se reporter à l'article de KOHLER et MILSTEIN déjà mentionné plus haut. En ce qui concerne des types de cellules de myélomes, des techniques préférées d'immunisation de l'animal contre les antigènes auxquels correspondent
20 les anticorps destinés à être produits par les cellules d'immunocytes, notamment les cellules spléniques qui seront fusionnées avec les cellules des lignées myélomateuses préférées, les animaux d'épreuve préférés et les conditions de culture aboutissant à la formation
25 des hybrides cellulaires du genre en question, on peut encore se reporter par exemple aux demandes de brevet européen n° 004515, 0018794 et 0018795 ou à la demande de brevet français n° 78 17545, publiée sous le n° 2.394.607.

30 La batterie préférée d'hybrides selon l'invention est caractérisée par trois groupes de lignées aptes à respectivement sécréter des anticorps actifs à l'égard de virus appartenant aux types (1), (2) et (3), et caractérisés en ce que :

- 35 (1) le premier groupe comprend trois catégories d'hybrides respectivement capables de produire des anticorps
- actifs à la fois contre les souches LSc 2ab et Mahoney,
- actifs contre la souche LSc 2ab, mais inactifs

6

- contre la souche Mahoney,
- actifs contre la souche Mahoney, mais inactifs contre la souche LSc 2ab ;
- (2) le deuxième groupe comprend trois catégories d'hybrides respectivement capables de produire des anticorps
- actifs à la fois contre les souches P 712 CH 2ab et MEF 1,
 - actifs contre la souche P 712 CH 2ab, mais inactifs contre la souche MEF 1,
 - actifs contre la souche MEF 1, mais inactifs contre la souche P 712 CH 2ab ;
- (3) le troisième groupe comprend trois catégories d'hybrides respectivement capables de produire des anticorps
- actifs à la fois contre les souches Leon 12a1b et Saukett,
 - actifs contre la souche Leon 12a1b, mais inactifs contre la souche Saukett,
 - actifs contre la souche Saukett, mais inactifs contre la souche Leon 12a1b.

- Un procédé d'obtention préférée d'une batterie d'hybrides cellulaires susceptibles de former la batterie d'anticorps susdite est caractérisé par les étapes qui consistent :
- à immuniser des animaux respectivement contre des virus appartenant aux trois types principaux (1), (2) et (3) et, à l'intérieur de chacun de ces types, à, d'une part, une souche sauvage et, d'autre part, à une souche atténuée ;
 - à prélever sur les animaux les cellules immunocytes, de préférence les cellules de la rate et à les mettre en culture ;
 - à fusionner les cellules de ces cultures avec des cellules d'une lignée myélomateuse ou analogue, propres

antiviraux respectant la souche ;

- à incuber ces clones cellulaires et à tester la capacité de leurs surnageants respectifs à inhiber l'effet cytopathogène de cultures de virus homologues dans des essais de séroneutralisation,
- 5 - à recueillir et à répartir en groupes les cultures d'hybrides cellulaires recueillies par types, selon les activités des anticorps qu'ils sont susceptibles de produire à l'égard des trois types de virus homologues considérés et, à l'intérieur de chaque groupe, par
- 10 catégorie d'hybrides cellulaires, en fonction de l'activité des anticorps qu'ils sont susceptibles de produire à l'égard des souches respectivement atténuées et sauvages homologues correspondantes,
- à sélectionner et récupérer dans chaque groupe et dans
- 15 chacune des deux catégories correspondantes, dans des essais répétés de séroneutralisation de cultures cellulaires sensibles, en présence, d'une part, de virus sauvages et, d'autre part, de virus atténués appartenant tous deux au même type, ceux des clones qui inhibent :
- 20 (1) à la fois le virus sauvage et le virus inactivé,
(2) le virus sauvage, à l'exclusion des virus atténués,
(3) le virus atténué, à l'exclusion des virus sauvages.

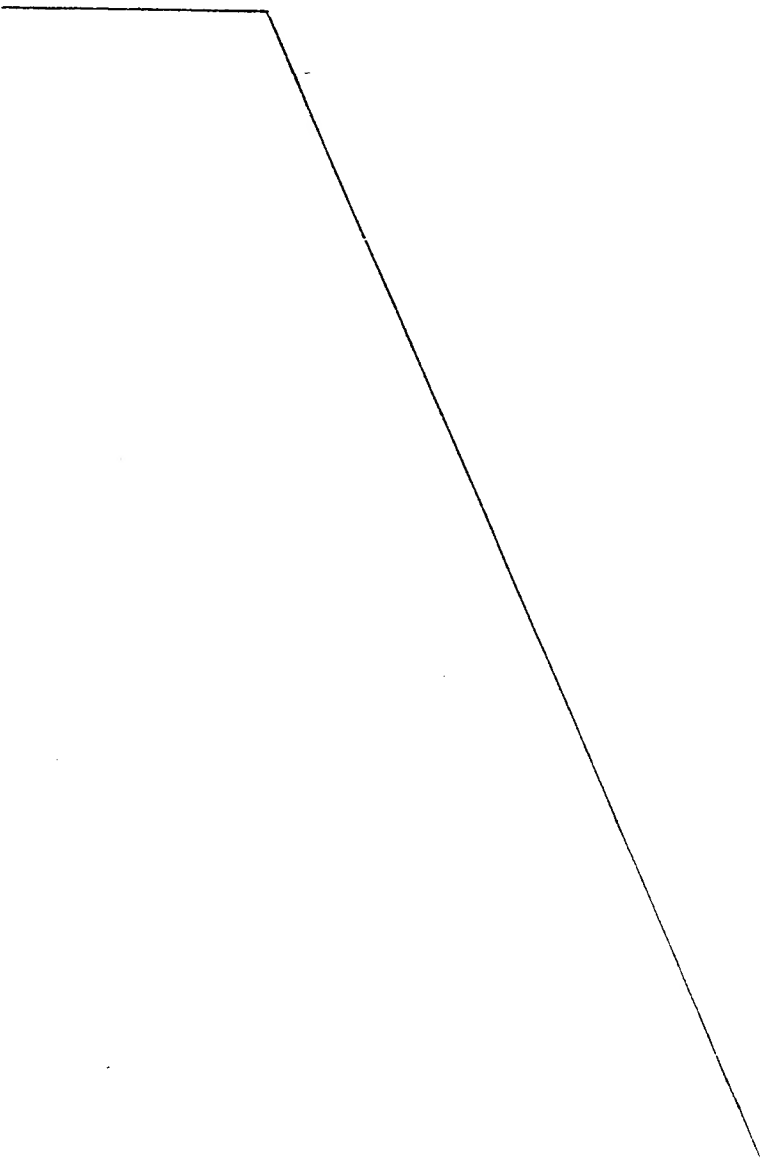
De préférence, les tests de séroneutralisation mis en oeuvre dans le susdit procédé sont réalisés sur

25 des cultures de cellules semblables, telles que cellules d'origine cancéreuses humaines couramment utilisées pour l'étude des poliovirus, par exemple les cellules HEp-2 ou Helo en présence de doses de 10^2 à 10^3 DCP 50 de virus homologues et hétérologues , dans les épreuves de sélection

30 finale, on recueille dans chacun des groupes considérés les clones qui produisent respectivement :

- les anticorps monoclonaux d'une première catégorie qui présentent un index de neutralisation au moins égal à 2, de préférence supérieur à 3, tant vis-à-vis de la
- 35 souche atténuée que de la souche sauvage correspondante,
- les anticorps monoclonaux d'une deuxième catégorie qui présentent un index de neutralisation au moins égal à 2, de préférence supérieur à 3, à l'égard de la souche atténuée, et un index de neutralisation pratiquement nul

8

- vis-à-vis de la souche sauvage,
- les anticorps monoclonaux d'une troisième catégorie, qui présentent un index de neutralisation au moins égal à 2, de préférence supérieur à 3, à l'égard de la souche
- 5 sauvage, et un index de neutralisation pratiquement nul vis-à-vis de la souche atténuée.
- 

On rappellera, pour mémoire, que les unités DCP 50 dont question dans ce qui précède représentent les doses cytopathogènes 50 de virus qui correspondent à la dilution de virus entraînant la mort de 50 % des hôtes sensibles à leur contact.

On rappellera aussi que l'expression "index de neutralisation" correspond à la différence entre les logarithmes des titres correspondant aux doses de virus nécessaires à la destruction de 50 % des cultures cellulaires sensibles au contact desquelles ils se trouvent placés, dans les conditions qui ont été rappelées ci-dessus, lorsque les mesures sont effectuées, d'une part, en présence et, d'autre part, en l'absence de la catégorie d'anticorps monoclonaux dont le niveau d'activité est recherché. En l'occurrence, on dira qu'une catégorie d'anticorps monoclonaux présente un index de neutralisation égal à 2, lorsque, en sa présence, le titre des virus nécessaires à l'obtention d'une destruction de 50 % des hôtes cellulaires à leur contact est égal à 100 fois la valeur du titre conduisant au même résultat, en l'absence de ces anticorps.

L'invention concerne également l'application des batteries d'anticorps monoclonaux selon l'invention à un diagnostic relatif au caractère atténué ou sauvage d'une souche inconnue nouvellement isolée, caractérisée par les étapes qui consistent :

- dans une première étape, en des essais de séroneutralisation de cultures de cellules sensibles en présence respectivement des trois anticorps monoclonaux de "première catégorie" des trois groupes susdits, le virus isolé étant présumé comme appartenant au premier, second ou troisième type, selon que le virus isolé est inhibé par l'anticorps appartenant aux susdits premier, deuxième et troisième groupes susdits, et
- dans une seconde étape, en des essais de séroneutralisation répétés dans des conditions semblables vis-à-vis d'anticorps respectivement de "deuxième catégorie" et "troisième catégorie" du groupe correspondant au type déterminé dans les premiers essais de séroneutra-

lisation, le virus isolé étant présumé comme appartenant à une souche atténuée ou sauvage, selon qu'il est inhibé par les anticorps de "deuxième catégorie" ou par les anticorps de "troisième catégorie".

5 De préférence, on réalise à des fins de contrôle les mêmes essais de séroneutralisation avec les mêmes anticorps à l'égard des virus homologues, tant en ce qui concerne le type qu'en ce qui concerne les catégories de virus homologues à l'intérieur de ce même type, 10 la présomption de rattachement du virus isolé à un type et à une catégorie particulière de souches à l'intérieur de ce type étant alors d'autant plus forte que les index de neutralisation mesurés sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la souche homologue, de même type 15 et de même catégorie.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples de fabrication de lignées cellulaires productrices des différents anticorps monoclonaux entrant dans 20 les groupes et catégories sus-définis, ainsi que des conditions de leur utilisation, notamment dans des épreuves de diagnostic du type et de la catégorie auxquels peut se rattacher un poliovirus nouvellement isolé chez un individu ou dans le milieu ambiant.

25 I - Préparation des hybridomes.

Les anticorps monoclonaux qui ont été préparés sont dirigés contre les souches suivantes :

Type 1 : a) souche Manoney - prototype de laboratoire pour le virus sauvage et virulent ;

30 b) souche LSc 2ab - prototype de virus atténué utilisé dans la préparation du vaccin oral ;

Type 2 : c) souche MEF 1 - prototype de laboratoire pour le virus sauvage et virulent ;

d) souche P 712 CH 2ab - prototype de virus

virus sauvage virulent ;

f) souche Leon 12a1b - prototype de laboratoire de virus atténué, utilisé dans la préparation du vaccin oral.

Plus particulièrement, on a préparé des anticorps monoclonaux qui ont en principe deux propriétés fondamentales :

- a) ils sont capables de reconnaître le type de poliovirus (1, 2 ou 3) ;
- b) ils sont capables, à l'intérieur de chaque type, de reconnaître le sous-type. Cette spécificité de sous-type permet la différenciation des souches sauvages de celles provenant du vaccin oral.

Les séquences successives de la préparation ont été les suivantes :

15 A - Immunisation des souris.

1. Antigène.

L'antigène pour l'immunisation des animaux est constitué d'une suspension de poliovirus active en partant des souches :

- 20 type 1 : Mahoney et LSc 2ab,
- type 2 : MEF 1 et P 712 CH2ab,
- type 3 : Saukett et Leon 12a1b.

Les virus sont d'abord inoculés sur des cultures de cellules humaines, HEp-2
25 qui proviennent d'un cancer humain. Lorsque les cellules sont complètement détruites par le virus, on récolte le liquide surnageant qui contient le virus. Cette suspension virale est ensuite ultracentrifugée pendant 3 heures à 100.000 x g pour concentrer le virus.

30 La suspension finale doit contenir une quantité de virus d'environ 10^9 unités infectieuses par millilitre.

2. Schéma d'immunisation.

Des groupes de 3-4 souris Balb/c reçoivent par voie intrapéritonéale une première injection de virus
35 (0,2 ml). Après quatre semaines, une deuxième injection avec la même quantité de virus est effectuée, cette fois par voie intraveineuse.

Trois à quatre jours après la dernière injection, les souris sont sacrifiées et la rate est prélevée et

mise en culture.

B - Mise en culture, fusion et sélection (myélome + cellules de rate).

Les cellules spléniques sont fusionnées avec les
 5 cellules HGPRT déficientes de la lignée myéломateuse
 Sp2/O-Ag14 (SHULMAN M., WILDE C.D. and KOHLER G. (1978) -
 "A better cell line for making hybridomas secreting spe-
 cific antibodies" - Nature, 276, 269-270). Les mélanges
 des cellules parentales sont incubés en présence de poly-
 10 éthylène-glycol (PEG) 1000 à 30 %. Après élimination du
 PEG, les cellules sont distribuées dans des plaques à
 cupules multiples. Après 48 heures d'incubation, le
 milieu sélectif contenant de l'azasérine (10 μ M) et de
 l'hypoxanthine (50 μ M) est ajouté. Ce milieu ne permet
 15 la croissance que des seules cellules hybrides dont les
 colonies deviennent visibles vers le huitième jour. A
 partir du quatorzième jour, les surnageants des cupules
 contenant les colonies hybrides suffisamment développées
 sont testés pour la présence des anticorps antipolio
 20 (voir § C). Les hybridomes positifs sont sous-clonés
 par la technique des dilutions limites pour, d'une part,
 s'assurer du caractère monoclonal des anticorps secrétés
 et, d'autre part, dans certains cas obtenir la stabilité
 de la sécrétion.

25 C - Sélection des hybridomes sécrétant des anticorps antipolio.

Tous les clones cellulaires obtenus après la
 fusion et la sélection ne secrètent pas les anticorps
 souhaités. Il est donc nécessaire de sélectionner :
 30 1°) les clones cellulaires fabriquant des anticorps et
 2°) les clones sécrétant une certaine catégorie d'anti-
 corps.

Dans ce but, on utilise la réaction de neutrali-
 sation et la réaction immunoenzymatique appelée ELISA
 35 (AVRAMEAS S. and TERNYNCK T. (1971) - "Peroxidase
 labelled antibodies and their use in immunological assays")

Clinical Immunology (Eds Rose H.R. & Friedman H.).
Amer. Soc. Microbiol., p. 506)

II - Détection des anticorps monoclonaux.

A - Séronéutralisation

5 Le surnageant de culture d'hybridomes à tester est
mis en contact deux heures à 37°C avec 100 DCP 50 de
virus homologue (le même que celui utilisé pour l'immuni-
sation des souris). L'effet cytopathogène restant est
10 déterminé sur une culture de cellules HEp-2. Les surna-
geants qui inhibent l'effet cytopathogène sont considé-
rés comme positifs et les clones de cellules qui l'ont
produit sont sélectionnés et utilisés comme source
d'anticorps monoclonaux (AM).

On effectue ensuite la sélection des AM spéci-
15 fiques dans les conditions qui ont été indiquées plus
haut par le titrage, pour chaque type, du pouvoir neutra-
lisant des AM correspondants contre la souche homologue
(par exemple la souche sauvage) et hétérologue (par
exemple la souche atténuée) du même type sérologique,
20 pour déterminer leurs index de neutralisation dans les
conditions qui ont été mentionnées plus haut et qui se-
ront rappelées plus loin, lorsque le même type de mesure
sera fait à l'égard de l'identification de souches
sauvages dans des essais de diagnostic *in vitro*.

25 B - Test immunoenzymatique.

L'antigène de référence (le virus utilisé comme
antigène immunisant) est fixé sur un support solide (par
exemple des plaques à 96 cupules en polystyrène, mem-
branes de nitrate de cellulose). Les surnageants des cul-
30 tures d'hybridomes sont mis en contact avec les sur-
faces recouvertes d'antigène. Si des AM homologues à
l'antigène existent, ils vont être retenus par l'anti-
gène. Leur présence peut être ensuite détectée avec des
anticorps anti-souris de chèvre marqués à la peroxydase.
35 La présence de la peroxydase détermine le changement de
couleur d'un réactif qui contient le substrat spécifique
de l'enzyme (H_2O_2). Donc, tout changement de couleur va

indiquer la présence dans le surnageant respectif des AM reconnaissant l'antigène utilisé dans le test.

III - Utilisation des anticorps monoclonaux antipolio-virus.

5 Exemple 1. Identification du type de poliovirus par les anticorps monoclonaux.

Le type sérologique d'un virus polio isolé en terrain peut être déterminé à l'aide des anticorps monoclonaux neutralisants spécifiques de type. On utilise une
10 batterie de trois AM, correspondant aux trois types du virus polio, dans un test de séroneutralisation. Une dose d'environ 10^2 - 10^3 DCP 50 de virus à tester est mise en contact avec chacun des trois types d'AM. Ensuite, l'effet cytopathogène (ECP) restant dans chaque mélange
15 virus-anticorps est déterminé sur une culture de cellules HEP-2. Le type de virus est établi par rapport au type d'AM qui ont neutralisé le virus (Tableau I). De préférence, on a recours à des essais comparatifs confirmatifs.

20 Tableau I

Virus polio	ECP après contact avec				Type du virus	
	milieu de culture	AM antipolio type				
		1	2	3		
25	réf. type 1	+	-	+	+	1
	réf. type 2	+	+	-	+	2
	réf. type 3	+	+	+	-	3
30	souche 2/73	+	+	-	+	2
	souche 35/74	+	+	+	-	3
	souche 6/80	+	-	+	+	1

Exemple 2. Détermination du sous-type de virus polio
(différenciation du virus sauvage du virus
atténué).

Les AM permettent, par leur capacité discriminatoire,
5 l'identification de l'origine génétique des souches de polio-
virus isolées en terrain. La caractérisation antigénique des
poliovirus dont le type a déjà été établi se fait avec des
AM spécifiques de souche (sauvage ou atténuée) avec un test
d'index de neutralisation. La souche à contrôler est titrée
10 en absence et en présence d'AM spécifiques des souches sau-
vage et atténuée du même type sérologique. L'appartenance
antigénique est établie par rapport à la différence du log
titre du virus en absence et en présence de chaque catégo-
rie d'AM (index de neutralisation). On considère une souche
15 comme ayant une origine sauvage ou atténuée quand l'index
de neutralisation face aux AM respectifs est du même ordre
que celui de la souche de référence homologue (tableau II).

Dans le tableau II, on présente un exemple de test
d'identification intratypique des trois souches de polio-
20 virus, pour établir leur origine sauvage (virus virulent :
S) ou atténuée (virus provenant du vaccin : A).

Tableau II

25	Virus polio type 1	Index de neutralisation a) face aux AM contre virus		Caractérisation antigénique b)
		Mahoney	LSc 2ab	
	<u>Références</u>			
	- Mahoney (sauvage)	3,5	0	S
	- LSc 2ab (atténuée)	0,5	4,0	A
	<u>à tester</u>			
30	- souche 8/79	3,5	0	S
	- souche 9/79	3,0	0	S
	- souche 21/80	0	4,5	A

a) Index de neutralisation = différence entre le log titre du
virus en absence et en présence des AM respectifs ;

35 b) S = sauvage (virulent, type Mahoney),
A = atténué (du vaccin, type LSc 2ab).

Les anticorps selon l'invention peuvent être utilisés tels quels, dans les surnageants de culture, après séparation des hybrides cellulaires.

5 Ces surnageants peuvent être conservés par congélation. Ils peuvent aussi être lyophilisés.

On peut également obtenir les anticorps à l'état purifié, notamment par précipitation à l'aide d'un agent, tel que le sulfate d'ammonium, susceptible de modifier la force ionique du milieu. Le caractère
10 monoclonal des anticorps permet d'atteindre des concentrations élevées.

Ces anticorps peuvent être l'objet de nombreuses applications.

Par exemple, il est évident qu'un autre avantage
15 considérable des anticorps monoclonaux est le fait qu'ils remplacent les animaux qui servent à produire les sérums hyperimmuns (lapin, cheval, veau, etc...).

A la place des animaux qui coûtent très chers et demandent un endroit spécial pour la mise en stabula-
20 tion et qui produisent des sérums de spécificité médiocre (mélanges d'anticorps inconnus et variables d'un animal à l'autre), l'invention permet de préparer des anticorps dans une culture de cellules au niveau du laboratoire.

Ils peuvent aussi être utilisés pour la préparation des colonnes de chromatographie d'affinité, par
25 exemple pour la production du vaccin ; ou encore comme sonde immunologique pour la détection des polypeptides viraux dans la cellule bactérienne ou animale.

Ce dernier cas concerne surtout la situation quand une copie du génome ARN du poliovirus où un segment
30 du génome est inséré dans la cellule bactérienne ou animale par les méthodes de recombinaison de l'ADN.

Les souches d'hybridomes appartenant à une batterie de souches préférées ont été déposées le 24 août 1981 à la Collection Nationale de Culture de Micro-

17

actifs

- contre à la fois LSc 2ab et Mahoney,
- contre LSc 2ab seulement,
- contre Mahoney seulement ;

5 (2) I-170 , I-173 et I-172 , pour les souches produisant des anticorps monoclonaux respectivement actifs

- contre à la fois P 712 CH 2ab et MEF 1,
- contre P 712 CH 2ab seulement
- 10 - contre MEF 1 seulement ;

(3) I-174 , I-175 et I-176 , pour les souches produisant des anticorps monoclonaux respectivement actifs

- contre à la fois Leon 12a1b et Saukett,
- 15 - contre Leon 12a1b seulement,
- contre Saukett seulement.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont
20 été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes.

REVENDICATIONS

- 1 - Batterie d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic et l'identification de poliovirus, caractérisée par trois groupes d'anticorps à l'égard de poliovirus, appartenant respectivement aux sous-types sérologiques
- 5 (1), (2) ou (3), les anticorps monoclonaux de chaque groupe se répartissant en
- une première catégorie d'anticorps actifs, mais ne présentant pas de différenciation intratypique,
 - une deuxième catégorie d'anticorps actifs contre les
 - 10 souches atténuées, mais essentiellement dépourvus d'activité à l'égard des souches sauvages correspondantes,
 - une troisième catégorie d'anticorps actifs contre la souche sauvage appartenant au sous-type sérologique considéré, mais essentiellement dépourvus d'activité à
 - 15 l'égard des souches atténuées correspondantes.

- 2 - Batterie d'anticorps monoclonaux selon la revendication 1, caractérisée en ce que les anticorps appartenant aux première et deuxième catégories dans chacun des groupes susdits sont respectivement actifs
- 20 contre :
- la souche LSc 2ab,
 - la souche P 712 CH 2ab,
 - la souche Leon 12a1b.

- 3 - Batterie d'anticorps monoclonaux selon la
- 25 revendication 1, caractérisée en ce que les anticorps appartenant aux première et troisième catégorie dans chacun des groupes susdits sont respectivement actifs contre :
- la souche Mahoney,
 - la souche MEF 1,
 - 30 - la souche Saukett.

- 4 - Batterie d'anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 3, caractérisée en ce que, dans chacun des susdits groupes :

- les anticorps de la deuxième catégorie présentent un index de neutralisation au moins égal à 2 à l'égard de souches atténuées et un index de neutralisation pratiquement nul à l'égard des souches sauvages,
- 5 - les anticorps de la troisième catégorie présentent un index de neutralisation au moins égal à 2 à l'égard des souches sauvages et un index de neutralisation pratiquement nul à l'égard des souches atténuées.

5 - Batterie selon la revendication 4, caracté-
10 risée en ce que les index de neutralisation non nuls, témoignant de l'activité des anticorps vis-à-vis d'un type ou sous-type déterminé de poliovirus, sont au moins égaux à 3.

6 - Batterie d'hybrides cellulaires pour la
15 production des groupes d'anticorps monoclonaux selon les revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'ils sont formés par des hybrides cellulaires résultant de la fusion des cellules d'une lignée myélomateuse et de cellules immunocytes, notamment de rates d'animaux, respectivement
20 vaccinés au préalable contre des poliovirus atténués, d'une part, sauvages, d'autre part, provenant de cultures des trois types correspondants.

7 - Batterie d'hybrides cellulaires selon la revendication 6, caractérisée par trois groupes de lignées
25 aptes à respectivement sécréter des anticorps actifs à l'égard de virus appartenant aux types (1), (2) et (3), et caractérisée en ce que :

- (1) le premier groupe comprend trois catégories d'hybrides respectivement capables de produire des anticorps
 - 30 - actifs à la fois contre les souches LSc 2ab et Mahoney,
 - actifs contre la souche LSc 2ab, mais inactifs contre la souche Mahoney,
 - actifs contre la souche Mahoney, mais inactifs
35 contre la souche LSc 2ab ;
- (2) le deuxième groupe comprend trois catégories d'hybrides respectivement capables de produire des anticorps

- actifs à la fois contre les souches P 712 CH 2ab et MEF 1,
 - actifs contre la souche P 712 CH 2ab, mais inactifs contre la souche MEF 1,
 - 5 - actifs contre la souche MEF 1, mais inactifs contre la souche P 712 CH 2ab ;
- (3) le troisième groupe comprend trois catégories d'hybrides respectivement capables de produire des anticorps
- actifs à la fois contre les souches Leon 12a1b et
 - 10 Saukett,
 - actifs contre la souche Leon 12a1b, mais inactifs contre la souche Saukett,
 - actifs contre la souche Saukett, mais inactifs contre la souche Leon 12a1b.
- 15 8 - Procédé d'obtention d'une batterie d'hybrides cellulaires susceptibles de former respectivement une batterie d'anticorps conformes à la revendication 7, caractérisé par les étapes qui consistent :
- à immuniser des animaux respectivement contre des
 - 20 virus appartenant aux trois types principaux (1), (2) et (3) et, à l'intérieur de chacun de ces types, à, d'une part, une souche sauvage et, d'autre part, à une souche atténuée ;
 - à prélever sur les animaux les cellules immunocytes,
 - 25 de préférence les cellules de la rate et à les mettre en culture ;
 - à fusionner les cellules de ces cultures avec des cellules d'une lignée myélomateuse ou analogue, propres à former des lignées d'hybrides cellulaires avec les
 - 30 précédentes, séparables des cellules myélomateuses non fusionnées, et à récupérer des clones cellulaires individualisés résultant de la fusion ;
 - à incuber ces clones cellulaires et à tester la capacité de leurs surnageants respectifs à inhiber l'effet
 - 35 cytopathogène de cultures de virus homologues dans des

les activités des anticorps qu'ils sont susceptibles de produire à l'égard des trois types de virus homologues considérés et, à l'intérieur de chaque groupe, par catégories d'hybrides cellulaires, en fonction de l'activité des anticorps qu'ils sont susceptibles de produire à l'égard des souches respectivement atténuées et sauvages homologues correspondantes,

- à sélectionner et récupérer dans chaque groupe et dans chacune des deux catégories correspondantes, dans des essais répétés de séroneutralisation de cultures cellulaires sensibles, en présence, d'une part, de virus sauvages et, d'autre part, de virus atténués appartenant tous deux au même type, ceux des clones qui inhibent :
 - (1) à la fois le virus sauvage et le virus inactivé,
 - (2) le virus sauvage, à l'exclusion des virus atténués,
 - (3) le virus atténué, à l'exclusion des virus sauvages.

9 - Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que les tests de séroneutralisation susdits sont réalisés sur des cultures de cellules sensibles en présence de doses de virus de 10^2 à 10^3 DCP 50 de virus homologues et que, dans l'épreuve de sélection finale, on recueille dans chacun des groupes considérés les clones qui produisent respectivement :

- les anticorps monoclonaux d'une première catégorie qui présentent un index de neutralisation au moins égal à 2, de préférence supérieur à 3, tant vis-à-vis de la souche atténuée que de la souche sauvage correspondante,
- les anticorps monoclonaux d'une deuxième catégorie qui présentent un index de neutralisation au moins égal à 2, de préférence supérieur à 3, à l'égard de la souche atténuée, et un index de neutralisation pratiquement nul vis-à-vis de la souche sauvage,
- les anticorps monoclonaux d'une troisième catégorie, qui présentent un index de neutralisation au moins égal à 2, de préférence supérieur à 3, à l'égard de la souche sauvage, et un index de neutralisation pratiquement nul vis-à-vis de la souche atténuée.

10 - Application des anticorps monoclonaux sur l'une quelconque des revendications 1 à 9 à un diagnostic relatif au caractère atténué ou sauvage d'une souche inconnue nouvellement isolée, caractérisée par

5 les étapes qui consistent :

- dans une première étape, en des essais de séroneutralisation de cultures de cellules sensibles en présence respectivement des trois anticorps monoclonaux de "première catégorie" des trois groupes susdits, le virus isolé étant présumé comme appartenant au premier, second ou troisième type, selon que le virus isolé est inhibé par l'anticorps appartenant aux susdits premier, deuxième et troisième groupes susdits, et

10
15
20
- dans une seconde étape, en des essais de séroneutralisation répétés dans des conditions semblables vis-à-vis d'anticorps respectivement de "deuxième catégorie" et "troisième catégorie" du groupe correspondant au type déterminé dans les premiers essais de séroneutralisation, le virus isolé étant présumé comme appartenant à une souche atténuée ou sauvage, selon qu'il est inhibé par les anticorps de "deuxième catégorie" ou par les anticorps de "troisième catégorie".

